

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 4 月 29 日 (29.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/035816 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/60, 1/26, 1/32, 1/44, G01N 33/92 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内 Shizuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013258 (74) 代理人: 岩橋 和幸 (IWAHASHI, Kazuyuki); 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和醸酵工業株式会社 知的財産室 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2003 年 10 月 16 日 (16.10.2003) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願 2002-301327 2002 年 10 月 16 日 (16.10.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和メデックス株式会社 (KYOWA MEDEX CO., LTD.) [JP/JP]; 〒104-0042 東京都中央区入船二丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 片山 有基 (KATAYAMA, Yuki) [JP/JP]; 〒411-0932 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1 協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内 Shizuoka (JP). 藤中 真由美 (FUJINAKA, Mayumi) [JP/JP]; 〒411-0932 静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地600番1
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD AND REAGENT FOR MEASURING CHOLESTEROL IN HIGH DENSITY LIPOPROTEINS

(54) 発明の名称: 高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法および試薬

(57) Abstract: A method of measuring cholesterol in high density lipoproteins contained in a specimen characterized by comprising reacting the specimen with i) cholesterol ester hydrolase and cholesterol oxidase, or ii) cholesterol ester hydrolase, an oxidized coenzyme and cholesterol dehydrogenase in an aqueous medium containing i) a nonionic surfactant, a polyanion and albumin, or ii) a polyoxyethylene alkylamine or a polyoxyethylene alkenylamine and a polyoxyethylene polycyclic phenyl ether sulfate or an anionic bile acid derivative, and then measuring the thus formed hydrogen peroxide or reduced coenzyme, and a reagent therefor.

(57) 要約: 検体と、i)コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、ii)コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、i)非イオン性界面活性剤、ポリアニオンおよびアルブミン、または、ii)ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよびポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体を含む水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法および試薬。

WO 2004/035816 A1

## 明 細 書

### 高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法および試薬

#### 技術分野

本発明は、検体中の高密度リポ蛋白（以下、HDLと略記する）中のコレステロールの測定方法、測定用試薬および測定用キットに関する。

#### 背景技術

生体中リポ蛋白は、その比重により高密度リポ蛋白、低密度リポ蛋白（以下、LDLと略記する）、超低密度リポ蛋白（以下、VLDLと略記する）、カイロミクロン（CM）に分類されており、それぞれ主にアポ蛋白の種類の違いによって生体中での働きが大きく異なっており、脂質組成もさまざまである。その中で、HDLは、動脈壁を含めた各組織からコレステロールを受け取るために細胞内に蓄積したコレステロールの除去作用に関係し、冠動脈硬化症をはじめとする各種動脈硬化症の危険予防因子であり、その血中レベルは動脈硬化性疾患の発症予知の有用な指針となることが知られている。

従来のHDL中のコレステロール（以下、HDLコレステロールと略記する）の測定法は、超遠心法、免疫化学的方法、電気泳動法、沈殿法等による分画操作とコレステロール定量操作の2段階からなる。しかしながら、分画操作は、操作が煩雑であり、長時間を要するものであり、また、安全性の点でも問題があった。従って、これらの分離操作を伴う測定法は極めて効率が悪く、実用化に適さない方法であった。

近年、上記の問題を解決するために、種々の測定法が報告されている。例えば、血清または血漿を、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、および、胆汁酸塩、胆汁酸誘導体またはジオクチルスルホサキシネートを含有する緩衝液中で当該酵素と反応させ、VLDLおよびLDL中のコレステロールをHDLコレステロールに先駆けて反応させ、生成した過酸化水素を測定した後、非イオン系のポリオキシエチレンオキシド基含有界面活性剤を反応液に添加し、HDLコレステロールと当該酵素とを反応させ、HDLコレステロールを特異的に分別定量する方法（特開昭62-69999号公報）、

血清を、特定の pH および特定の温度の下、膵臓由来のコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、胆汁酸群の界面活性剤、および、非イオン系界面活性剤を含有する緩衝液中で当該酵素と反応させることにより HDL コレステロールを測定する方法（特開昭 63-126498 号公報）が知られている。特許文献 2 に記載の測定法では、まず、LDL コレステロールと当該酵素との反応が進行し、次いで、HDL コレステロールと当該酵素との反応が進行し、HDL コレステロールの測定が可能となる。しかしながら、これらの測定法は、測定に長時間を要し、また、必ずしも、HDL コレステロールに特異的な測定法ではなかった。

HDL 以外のリポ蛋白を凝集させて HDL コレステロールを測定する方法としては、例えばデキストラン硫酸等の HDL 以外のリポ蛋白を凝集させる試薬、2 価の金属塩、および、化学的に修飾された酵素を用いる測定法（特開平 8-131197 号公報）、ポリアニオン等の HDL 以外のリポ蛋白と複合体を形成する試薬と、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン縮合物等のリポ蛋白を溶解しない界面活性剤とを用いる測定法（特開平 8-201393 号公報）、デキストラン硫酸等のポリアニオン、2 価の金属塩、特定の非イオン性界面活性剤および試料由来のアルブミンとは別異のアルブミンとを用いる測定法（特開平 9-285298 号公報）、血清または血漿を、リポ蛋白分画剤（デキストラン硫酸等のポリアニオンとマグネシウムイオン等の 2 価陽イオンとの組み合わせ）を含む溶液で処理し、得られた混合液を固体および液体の分離処理することなく、アニオン性界面活性剤（アルキルスルホン酸または胆汁酸もしくはその誘導体）の存在下に、コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼと反応させ、生成した過酸化水素を測定することを特徴とする血清または血漿中の HDL コレステロールを測定する方法（特開平 8-116996 号公報）、生体試料に、ポリアニオン等の HDL 以外のリポ蛋白質と複合体を形成する物質と、リポ蛋白質を溶解しない特定の界面活性剤とを添加した後、酵素的に HDL コレステロールを測定する方法（特開平 8-201393 号公報）等が知られている。

しかしながら、これらのHDL以外のリポ蛋白を凝集させるHDLコレステロール測定法においては、従来の基準法と良好な相関性があるものの、反応で生成する凝集物による濁りに起因する不正確性、反応セルのアルカリ洗浄の際に、反応液中の金属塩との反応で生成する金属水酸化物の析出による自動分析装置への過度の負荷等の問題がある。

HDL以外のリポ蛋白を凝集させずにHDLコレステロールを測定する方法としては、例えば、生体試料と、膵臓由来のコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼとを、胆汁酸もしくはその塩およびアルブミン存在下に反応させ、当該酵素反応により消費または生成する化合物を測定することによる生体試料中のHDLコレステロールの測定方法（国際公開第97/40376号パンフレット）、HDL画分に対して反応選択性をもつHLB値が16以上の非イオン性界面活性剤の存在下に、検体と、HDL画分に優先的に作用するリポプロテインリパーゼおよび／またはコレステロールエステラーゼならびにコレステロール酸化酵素とを反応させて、検体中のHDLコレステロールを測定する方法（国際公開第00/52480号パンフレット）等が知られている。また、アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルによりHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールを優先的に過酸化水素へ変換し、生成した過酸化水素を消去した後、ポリオキシエチレンアルキルエーテルの添加により、HDLコレステロールを酵素的に測定する方法（特開平9-299号公報）も知られている。

しかしながら、これらのHDL以外のリポ蛋白を凝集させないHDLコレステロールの測定法においては、HDL以外のリポ蛋白中コレステロールの不完全な消去や、HDL以外のリポ蛋白中のコレステロールに対する非特異反応に起因する測定値の不正確性が問題となる場合がある。

また、光学的手法により検体中の特定物質の測定を行う場合、M蛋白血症や骨髄腫等の患者由来の検体では、水不溶性の蛋白に起因する濁りが光学的な影響を与えることが大きな問題となっている。この光学的な影響を回避するために、反応液中の塩類を高濃度とし、水不溶性蛋白に起因する濁りを解消させる

方法が一般的に知られている。しかしながら、HDLコレステロールの測定においては、高濃度の塩類を存在させることにより、HDLコレステロールに対する特異性の低下や、さらには含有されている酵素の失活を招く場合があることから、高濃度の塩類の存在下でのHDLコレステロールの測定は、極めて困難である場合が多い。

### 発明の開示

本発明の目的は、簡便で、かつ、正確な測定ができるHDLコレステロールの測定方法、測定用試薬および測定用キットを提供することにある。

本発明は、下記〔1〕～〔37〕に関する。

〔1〕 検体と、i) コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、ii) コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、非イオン性界面活性剤、ポリアニオンおよびアルブミンを含有する水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法。

〔2〕 水性媒体が、さらに、胆汁酸誘導体を含有する〔1〕記載の測定方法。

〔3〕 胆汁酸誘導体が、陰イオン性胆汁酸誘導体である〔2〕記載の測定方法。

〔4〕 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンである〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の測定方法。

〔5〕 ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の測定方法。

〔6〕 非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

〔7〕 非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、コレステロー

ルエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

[8] さらに、還元型補酵素測定用試薬を含有する [7] 記載の試薬。

[9] さらに、胆汁酸誘導体を含有する [6] ~ [8] のいずれかに記載の試薬。

[10] 胆汁酸誘導体が、陰イオン性胆汁酸誘導体である [9] 記載の試薬。

[11] 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンである [6] ~ [10] のいずれかに記載の試薬。

[12] ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である [6] ~ [11] のいずれかに記載の試薬。

[13] 第一試薬および第二試薬からなるキットであって、ポリアニオン、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび過酸化水素測定試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有し、コレステロール酸化酵素を第二試薬に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

[14] ポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、コレステロールエステル加水分解酵素、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび過酸化水素測定試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

[15] 第一試薬および第二試薬からなるキットであって、コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび酸化型補酵素を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有し、コレステロール脱水素酵素を第二試薬に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

[16] ポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬とを含有し、コレステロールエステル加水分解酵素、非イ

オン性界面活性剤、アルブミンおよび酸化型補酵素を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

[17] さらに、還元型補酵素測定用試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する[15]または[16]に記載のキット。

[18] さらに、胆汁酸誘導体を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する[13]～[17]のいずれかに記載のキット。

[19] 胆汁酸誘導体が、陰イオン性胆汁酸誘導体である[18]に記載のキット。

[20] 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンである[13]～[19]のいずれかに記載のキット。

[21] ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である[13]～[20]のいずれかに記載のキット。

[22] 検体と、i) コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、ii) コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、i) 非イオン性界面活性剤、ポリアニオンおよびアルブミン、または、ii) ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよびポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体を含有する水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法。

[23] 検体と、i) コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、ii) コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよびポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体を含有する水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定す

ることを特徴とする検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法。

〔24〕 さらにポリアニオンを含有する〔23〕記載の方法。

〔25〕 ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である〔23〕または〔24〕記載の方法。

〔26〕 さらにアルブミンを含有する〔23〕～〔25〕のいずれかに記載の方法。

〔27〕 ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体、コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

〔28〕 ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体、コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

〔29〕 さらに、還元型補酵素測定用試薬を含有する〔28〕記載の試薬。

〔30〕 さらにポリアニオンを含有する〔27〕～〔29〕のいずれかに記載の試薬。

〔31〕 ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である〔30〕に記載の試薬。

〔32〕 さらにアルブミンを含有する〔27〕～〔31〕のいずれかに記載の試薬。

〔33〕 第一試薬および第二試薬からなるキットであって、コレステロールエステル加水分解酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体および過酸化水素測定試薬の各々を任意に第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有し、コレステロール



酸化酵素を第二試薬に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

〔34〕 第一試薬および第二試薬からなるキットであって、コレステロールエステル加水分解酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体および酸化型補酵素の各々を任意に第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有し、コレステロール脱水素酵素を第二試薬に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

〔35〕 さらに、第一試薬と第二試薬のいずれかまたは両方に、還元型補酵素測定用試薬を含有する〔34〕記載のキット。

〔36〕 さらに、第一試薬と第二試薬のいずれかまたは両方に、ポリアニオンを含有する〔33〕～〔35〕のいずれかに記載のキット。

〔37〕 さらに、第一試薬と第二試薬のいずれかまたは両方に、アルブミンを含有する〔33〕～〔37〕のいずれかに記載のキット。

本発明のHDLコレステロールの測定方法は、HDL以外のリポ蛋白中のコレステロールを消去することなく、HDLコレステロールを特異的に測定する方法である。

本発明の測定方法において用いられる検体としては、例えば全血、血漿、血清、髄液、唾液、羊水、尿、汗、涙液等が挙げられるが、血漿および血清が好ましい。

本発明におけるコレステロールエステル加水分解酵素としては、コレステロールエステルを加水分解する能力を有する酵素であれば特に限定はなく、例えば動物、植物または微生物由来のコレステロールエステラーゼ、リポプロテインリパーゼの他、遺伝子工学的な手法により製造されるコレステロールエステラーゼ、リポプロテインリパーゼ等も用いることができる。

コレステロールエステル加水分解酵素としては、無修飾のコレステロールエ

ステル加水分解酵素も、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素も使用することができる。また、コレステロールエステル加水分解酵素としては市販品を使用することもできる。

市販されているコレステロールエステル加水分解酵素としては、例えばコレステロールエステラーゼ “Amano” 2 (CHE 2 ; 天野エンザイム社製)、コレステロールエステラーゼ “Amano” 3 (CHE 3 ; 天野エンザイム社製)、リボプロテインリパーゼ (LPL 311 ; 東洋紡製社製)、リボプロテインリパーゼ “Amano” 6 (LPL 6 ; 天野エンザイム社製)、コレステロールエステラーゼ [COE 313 (化学的に修飾されたコレステロールエステラーゼ) ; 東洋紡績社製] 等が挙げられる。また、本発明においては、2種類以上のコレステロールエステル加水分解酵素を組み合わせることもできる。

コレステロールエステル加水分解酵素の化学修飾において当該酵素を修飾する基 (化学修飾基) としては、例えばポリエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールの共重合体を有する基、水溶性多糖類を含有する基、スルホプロピル基、スルホブチル基、ポリウレタン基、キレート機能を有する基等が挙げられるが、ポリエチレングリコールを主成分とする基が好ましい。水溶性多糖類としては、例えばデキストラン、プルラン、可溶性デンプン等が挙げられる。

コレステロールエステル加水分解酵素を化学的に修飾するための試薬 (化学修飾剤) としては、上記の化学修飾基と、酵素のアミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基等と反応し得る官能基または構造とを併せ持つ化合物等が挙げられる。酵素中のアミノ基と反応し得る官能基または構造としては、例えばカルボキシル基、活性エステル基 (N-ヒドロキシサクシンイミド基等)、酸無水物、酸塩化物、アルデヒド、エポキシド基、1, 3-プロパンスルトン、1, 4-ブタンスルトン等が挙げられる。酵素中のカルボキシル基と反応し得る官能基または構造としては、例えばアミノ基等が挙げられる。酵素中のスルフヒドリル基と反応性がある基または構造としては、例えばマレイミド基、ジ

スルフィド、 $\alpha$ -ハロエステル ( $\alpha$ -ヨードエステル等) 等が挙げられる。

化学修飾剤として、市販品を使用することもできる。市販されている化学修飾剤としては、ポリエチレングリコールを主成分とする基とN-ヒドロキシサクシンイミド基とを有するサンブライトVFM-4101、サンブライトMEAC-50HSおよびサンブライトMEC-50HS (いずれも日本油脂社製)、ポリアルキレングリコールを主成分とする基と酸無水物構造とを有するサンブライトAKMシリーズ (例えば、サンブライトAKM-1510等)、サンブライトADMシリーズおよびサンブライトACMシリーズ (いずれも日本油脂社製)、ポリエチレングリコールを主成分とする基とエポキシド基とを有するEPOX-3400およびM-EPOX-5000 (いずれもSheawater Polymers社製)、キレート機能を有する基と酸無水物構造とを有するジエチレントリアミン-N, N, N', N'', N''-ペンタ無水酢酸 (DTPA anhydride; 同仁化学社製) 等が挙げられる。

コレステロールエステル加水分解酵素の化学修飾方法は特に制限はなく、例えば、コレステロールエステル加水分解酵素をpH8.0以上の緩衝液 (例えばHEPES緩衝液) に溶解し、0~55℃で0.01~500倍モル量の化学修飾剤を添加し、5分間~5時間攪拌することにより行うことができる。本発明に使用する化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素としては、この反応液そのもの、必要に応じて限外濾過膜等により未反応の化学修飾剤等を除去したものも使用することもできる。

本反応の方法に用いられるコレステロールエステル加水分解酵素の濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中で0.01~200U/mLの濃度であることが好ましく、0.02~100U/mLであることがより好ましい。

本発明におけるコレステロール酸化酵素としては、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する能力を有する酵素であれば特に制限はなく、例えば動物、植物または微生物由来のコレステロールオキシダーゼの他、遺伝子工学的な手法により製造されるコレステロールオキシダーゼ等も用いることができ、

コレステロールオキシダーゼ “Amano” 1 (CHOD 1 ; 天野エンザイム社製)、コレステロールオキシダーゼ (CO-PE ; キッコーマン社製)、コレステロールオキシダーゼ (COO 3 2 1 ; 東洋紡績社製) 等の市販品を用いることもできる。また、本発明においては、2種類以上のコレステロール酸化酵素を組み合わせることもできる。

コレステロール酸化酵素は、無修飾の酵素であっても、化学的に修飾された酵素であってもよい。化学的に修飾されたコレステロール酸化酵素は、例えば前述の化学修飾剤を用いて、前述の化学修飾方法により作製することができる。

本反応の方法に用いられるコレステロール酸化酵素の濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中で0.01~200U/mLの濃度であることが好ましく、0.02~100U/mLの濃度であることがより好ましい。

本発明におけるコレステロール脱水素酵素としては、酸化型補酵素の存在下にコレステロールを酸化して還元型補酵素を生成する能力を有する酵素であれば特に制限はなく、例えば動物、植物または微生物由来のコレステロールデヒドロゲナーゼの他、遺伝子工学的な手法により製造されるコレステロールデヒドロゲナーゼ等も用いることができる。コレステロールデヒドロゲナーゼ “Amano” 5 (CHDH 5 ; 天野エンザイム社製) 等の市販品を用いることもできる。また、本発明においては、2種類以上のコレステロール脱水素酵素を組み合わせることもできる。コレステロール脱水素酵素は、無修飾の酵素であっても、化学的に修飾された酵素であってもよい。化学的に修飾されたコレステロール脱水素酵素は、例えば前述の化学修飾剤を用いて、前述の化学修飾方法により作製することができる。

本反応の方法に用いられるコレステロール脱水素酵素の濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中で0.01~200U/mLの濃度であることが好ましく、0.02~100U/mLの濃度であることがより好ましい。

本発明のコレステロール脱水素酵素を用いた測定法においては、酸化型補酵

素が使用される。酸化型補酵素としては、例えばNAD、NADP、チオーNAD、チオーNADP等が挙げられる。

本発明において用いられるアルブミンとしては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とするアルブミンであれば特に限定はなく、例えばウシ、ウマ、ヒツジ、ヒト由来のアルブミン等が挙げられるが、ウシ血清アルブミン（BSA）が好ましい。また、遺伝子工学的な手法により製造されたアルブミンも用いることができる。本発明においては、2種類以上のアルブミンを組み合わせ使用することもできる。本発明のHDLコレステロールの測定におけるアルブミンの濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が0.001～10%であることが好ましく、0.01～1%がより好ましい。

本発明において用いられるポリアニオンとしては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とするポリアニオンであれば特に制限はなく、例えばデキストラン硫酸もしくはその塩、ヘパリンもしくはその塩、リンタングステン酸またはその塩、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩、カラギーナン等が挙げられるが、デキストラン硫酸もしくはその塩が好ましい。デキストラン硫酸としては、例えば分子量が4万、8万、20万、50万、100万、200万等のデキストラン硫酸が挙げられる。硫酸化オリゴ糖としては、例えば硫酸化アガロース、硫酸化トレハロース、コンドロイチン硫酸等が挙げられる。塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩等が挙げられる。また、本発明においては、ポリアニオンを2種以上用いてもよい。

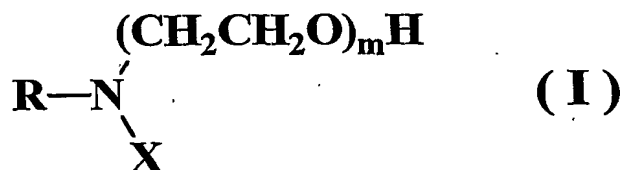
本発明のHDLコレステロールの測定におけるポリアニオンの濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が0.001～10%であることが好ましく、0.01～1%がより好ましい。

本発明において用いられる非イオン性界面活性剤としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする非イオン性界面活性剤であれば特に制限は

なく、例えばポリオキシエチレンアルキルアミン、ポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルケニルエーテル、ポリオキシエチレンアリールエーテル誘導体、エチレンジアミンテトラポリオキシアルキレン等が挙げられる。

非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルアミンおよびポリオキシエチレンアルケニルアミンが好ましい。

ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンとしては、例えば一般式 (I)



[式中、Rは直鎖または分岐状のアルキル基またはアルケニル基を表し、Xは水素原子または $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ を表し、mおよびnは同一または異なっており、1～100の整数を表し、 $m+n$ は2～200の整数である]で表される化合物[以下、化合物 (I) という]が挙げられる。

ポリオキシエチレンアルキルアミン、化合物 (I) およびポリオキシエチレンアルキルエーテルにおけるアルキルとしては、直鎖または分岐状の炭素数6～30の、例えばヘキシル、ヘプチル、オクチル、イソオクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル (ラウリル)、トリデシル、テトラデシル (ミリスチル)、ペンタデシル、ヘキサデシル (セチル)、ヘプタデシル、オクタデシル (ステアリル)、ノナデシル、イコシル、ヘネイコシル、ドコシル (ベヘニル) 等が挙げらる。

ポリオキシエチレンアルケニルアミン、化合物 (I) およびポリオキシエチレンアルケニルエーテルにおけるアルケニルとしては、直鎖または分枝上の炭素数6～30の、例えばヘキセニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、デセニル、シトロネニル、ウンデセニル、ドデセニル、トリデセニル、テトラデセニル、ペンタデセニル、ヘキサデセニル、ヘプタデセニル、オレイル、ノナデセニル、エイコセニル、ヘンエイコセニル、ドコセニル、トリコセニル、テ

トラコセニル、ペンタコセニル、ヘキサコセニル、ヘプタコセニル、オクタコセニル、ノナコセニル、トリアコンテニル等が挙げられる。

ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンの具体例（製品）としては、例えばナイミーンL201（オキシエチレンドデシルアミン；日本油脂社製）、ナイミーンL207（ポリオキシエチレンドデシルアミン；日本油脂社製）、ナイミーンS204、ナイミーンS210（ポリオキシエチレンオクタデシルアミン；日本油脂社製）、ニューコールOD420（ポリオキシエチレンオクタデシルアミン；日本乳化剤社製）、パイオニンD3104（ポリオキシエチレンラウリルアミン；竹本油脂社製）、パイオニンD3110（ポリオキシエチレンラウリルアミン；竹本油脂社製）、パイオニンD3605〔ポリオキシエチレンアルキル（大豆）アミン；竹本油脂社製〕、パイオニンD3615T〔ポリオキシエチレンアルキル（牛脂）アミン；竹本油脂社製〕、BLAUNON O209（ポリオキシエチレンオレイルアミノエーテル；青木油脂社製）等が挙げられる。

ポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはポリオキシエチレンアルケニルエーテルの具体例（製品）としては、例えばエマルミンL90S（ポリオキシエチレンラウリルエーテル；三洋化成社製）、ニューコール1310（ポリオキシエチレントリデシルエーテル；日本乳化剤社製）、BLAUNON-EN1520（ポリオキシエチレンオレイルエーテル；青木油脂社製）等が挙げられる。

ポリオキシエチレンアリアルエーテル誘導体としては、例えばポリオキシエチレンスチレン化フェニルエーテル、ポリオキシアルキレンスチレン化フェニルエーテル、ポリオキシエチレンスチレン化メチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンスチリルフェニルエーテル縮合物、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルホルムアルデヒド縮合物等が挙げられる。

ポリオキシエチレンアリアルエーテル誘導体の具体例（製品）としては、例えばニューコール2604、ニューコール710（いずれもポリオキシエチレ

ン多環フェニルエーテル；日本乳化剤社製)、ニューコール2608F(ポリオキシアリレン多環フェニルエーテル；日本乳化剤社製)、パイオニンD6310、パイオニンD6320(いずれもポリオキシエチレンスチリルフェニルエーテル縮合物；竹本油脂社製)、ニッコールR1020(ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルホルムアルデヒド縮合物；日光ケミカルズ社製)などが挙げられる。

エチレンジアミンテトラポリオキシアリレンとしては、例えばエチレンジアミンポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物、エチレンジアミンテトラポリオキシエチレン、エチレンジアミンテトラポリオキシプロピレン等が挙げられる。

エチレンジアミンテトラポリオキシアリレンの具体例(製品)としては、例えばアデカプルロニックTR704、アデカプルロニックTR701、アデカプルロニックTR913R(いずれもエチレンジアミンポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物；旭電化社製)、ユニループ32TY-65BI(エチレンジアミンテトラポリオキシアリレン；日本油脂社製)等が挙げられる。

ポリオキシエチレンアルキルアミン、ポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルケニルエーテル、ポリオキシエチレンアリールエーテル誘導体およびエチレンジアミンテトラポリオキシアリレンにおけるオキシアリレン鎖(オキシエチレン鎖またはオキシプロピレン鎖)の重合数は、好ましくは1~100、より好ましくは1~60である。

ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルとしては、例えばポリオキシエチレンスチレン化フェニルエーテル硫酸エステル、ポリオキシエチレンベンジルフェニルエーテル硫酸エステル等が挙げられる。

ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルの具体例(製品)としては、例えばニューコール707SF、707SN、714SF、723SF、740SF(いずれも日本乳化剤社製)等が挙げられる。ポリオキシエチ



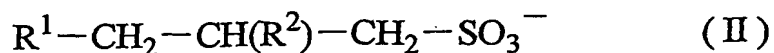
レン多環フェニルエーテル硫酸エステルにおけるオキシエチレン鎖の重合数としては、1～100が好ましく、5～40がより好ましい。

本発明においては、非イオン性界面活性剤を2種類以上用いてもよい。本発明のHDLコレステロールの測定方法における非イオン性界面活性剤の濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が0.0001～10%であることが好ましく、0.001～1%がより好ましい。

本発明における胆汁酸誘導体としては、例えば陰イオン性胆汁酸誘導体、両性胆汁酸誘導体、非イオン性胆汁酸誘導体等が挙げられるが、陰イオン性胆汁酸誘導体が好ましい。

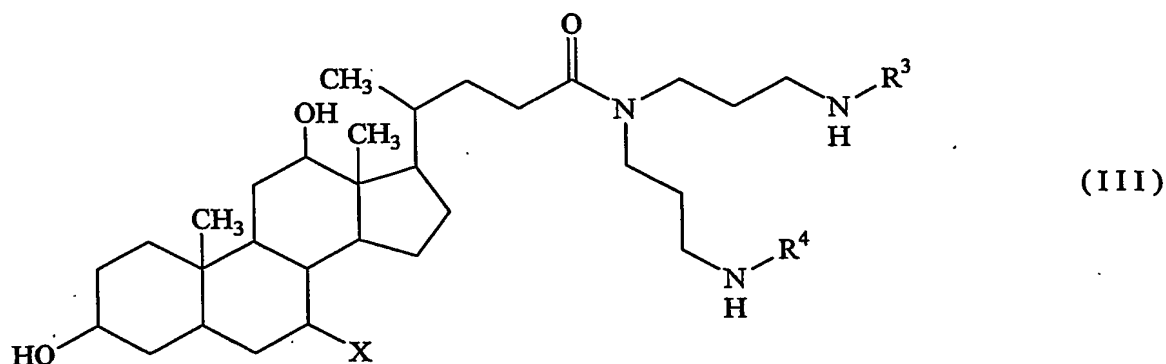
陰イオン性胆汁酸誘導体としては、例えばコール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、デヒドロコール酸もしくはその塩等が挙げられる。塩としては、例えばアンモニウム塩、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等が挙げられる。

両性胆汁酸誘導体としては、例えば一般式 (I I)



[式中、 $R^1$ は、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ基であり、 $R^2$ は、水素原子または水酸基である]で表される化合物[以下、化合物 (I I) という]等が挙げられる。以下、 $R^2$ が水素原子である化合物 (I I) をCHAPSと、 $R^2$ が水酸基である化合物 (I) をCHAPSOとよぶ。

非イオン性胆汁酸誘導体としては、例えば一般式 (I I I)



(Xは、水素原子または水酸基を表し、 $R^3$ および $R^4$ は、同一または異なって、置換もしくは非置換のアルキル、または、置換もしくは非置換のアルカノイルを表す) で表される化合物〔以下、化合物 (III) という〕等が挙げられる。アルキル、アルカノイルにおけるアルキルとしては、直鎖または分岐状の炭素数1~10の、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル等が挙げられる。置換アルキルおよび置換アルカノイルにおける置換基としては、例えば水酸基、ハロゲン原子等が挙げられる。ハロゲン原子は、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素の各原子を意味する。化合物 (III) のうち、 $R^3$ および $R^4$ が共に、



(以下、置換基Aという) である化合物が好ましい。以下、X、 $R^3$ および $R^4$ がそれぞれ、水素原子、置換基Aおよび置換基Aである化合物を *deoxy-BIGCHAP*、水酸基、置換基Aおよび置換基Aである化合物を *BIGCHAP* とよぶ。

胆汁酸誘導体の濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が0.001~10%であることが好ましく、0.01~1%がより好ましい。

本発明のHDLコレステロール測定方法において使用される水性媒体としては、例えば脱イオン水、蒸留水、緩衝液等が挙げられるが、緩衝液が好ましい。

緩衝液に用いる緩衝剤としては、例えばトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝剤、リン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、グッドの緩衝剤等が挙げられる。

グッドの緩衝剤としては、例えば2-モルホリノエタンスルホン酸 (MES)、ビス (2-ヒドロキシエチル) イミノトリス (ヒドロキシメチル) メタン (Bis-Tris)、N- (2-アセトアミド) イミノ二酢酸 (ADA)、ピペラジン-N, N'-ビス (2-エタンスルホン酸) (PIPES)、N- (2-アセトアミド) -2-アミノエタンスルホン酸 (ACES)、3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (MOPSO)、N, N'-ビス (2-ヒドロキシエチル) -2-アミノエタンスルホン酸 (BES)、3-モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPS)、N- [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] -2-アミノエタンスルホン酸 (TES)、2- [4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジニル] エタンスルホン酸 (HEPES)、3- [N, N'-ビス (2-ヒドロキシエチル) アミノ] -2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (DIPSO)、N- [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] -2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸 (TAPSO)、ピペラジン-N, N'-ビス (2-ヒドロキシプロパンスルホン酸) (POPSO)、3- [4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジニル] -2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (HEPPSO)、3- [4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジニル] プロパンスルホン酸 [(H) EPPS]、N- [トリス (ヒドロキシメチル) メチル] グリシン (Tricine)、N, N'-ビス (2-ヒドロキシエチル) グリシン (Bicine)、N-トリス (ヒドロキシメチル) メチル-3-アミノプロパンスルホン酸 (TAPS)、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸 (CHES)、N-シクロヘキシル-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸 (CAPSO)、N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸 (CAPS) 等が挙げられる。

緩衝液の濃度は測定に適した濃度であれば特に制限はされないが、0.001~2.0mol/Lが好ましく、0.005~1.0mol/Lがより好ましい。

以下に、本発明のHDLコレステロールの測定方法、測定用試薬および測定用キットを具体的に説明する。

### (HDLコレステロールの測定方法)

本発明のHDLコレステロールの測定方法としては、例えば以下の態様の方法が挙げられる。

#### 測定方法 1

(1) 検体と、 i) コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、 ii) コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、非イオン性界面活性剤、ポリアニオンおよびアルブミンを含有し、必要に応じ安定化剤、防腐剤、影響物質消去剤、反応促進剤等を含有する水性媒体中で反応させ、

(2) 必要に応じて過酸化水素測定用試薬または還元型補酵素測定試薬の存在下に、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定し、

(3) (2) で測定した値と、予め作成した検量線とから、検体中のHDLコレステロール濃度を算出することにより、検体中のHDLコレステロールを測定することができる。

#### 測定方法 2

(1) 検体と、 i) コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、 ii) コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミンおよび胆汁酸誘導体を含有し、必要に応じ安定化剤、防腐剤、影響物質消去剤、反応促進剤等を含有する水性媒体中で反応させ、

(2) 必要に応じて過酸化水素測定用試薬または還元型補酵素測定試薬の存在下に、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定し、

(3) (2) で測定した値と、予め作成した検量線とから、検体中のHDLコレステロール濃度を算出することにより、検体中のHDLコレステロールを測定することができる。

#### 測定方法 3

(1) 検体と、 i) コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、 ii) コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補

酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよびポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体を含有し、必要に応じポリアニオン、アルブミン、安定化剤、防腐剤、影響物質消去剤、反応促進剤等を含有する水性媒体中で反応させ、

(2) 必要に応じて過酸化水素測定用試薬または還元型補酵素測定試薬の存在下に、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定し、

(3) (2) で測定した値と、予め作成した検量線とから、検体中のHDLコレステロール濃度を算出することにより、検体中のHDLコレステロールを測定することができる。

#### 測定方法4

(1) 検体と、i) コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、ii) コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルおよび陰イオン性胆汁酸誘導体を含有し、必要に応じポリアニオン、アルブミン、安定化剤、防腐剤、影響物質消去剤、反応促進剤等を含有する水性媒体中で反応させ、

(2) 必要に応じて過酸化水素測定用試薬または還元型補酵素測定試薬の存在下に、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定し、

(3) (2) で測定した値と、予め作成した検量線とから、検体中のHDLコレステロール濃度を算出することにより、検体中のHDLコレステロールを測定することができる。

水性媒体としては、例えば前述の水性媒体等が挙げられる。安定化剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、シュウクロース、塩化カルシウム等が挙げられる。防腐剤としては、例えばアジ化ナトリウム、抗生物質等が挙げられる。影響物質消去剤としては、例えばアスコルビン酸の影響を消去するためのアスコルビン酸オキシダーゼ等が挙げられる。反応促進剤として

は、例えばコリパーゼ、ホスホリパーゼ等の酵素、硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム等の塩類等が挙げられる。

本測定法においては、(1) および (2) の反応は、同一または異なる条件下、同時または順次に、それぞれ、例えば 10～50℃で、好ましくは 20～40℃で、1～60分間、好ましくは 2～30分間行う。

生成した過酸化水素の量は、例えば過酸化水素測定用試薬により測定することができる。過酸化水素測定用試薬は、生成した過酸化水素を検出可能な物質へ変換するための試薬である。検出可能な物質としては、例えば色素、発光等が挙げられるが、色素が好ましい。検出可能な物質が色素の場合には、過酸化水素測定用試薬は、酸化発色型色原体およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質を含有する。酸化発色型色原体としては、例えば後述の酸化発色型色原体が挙げられる。検出可能な物質が発光の場合には、過酸化水素測定用試薬は、化学発光物質を含有する。化学発光物質としては、例えばルミノール、イソルミノール、ルシゲニン、アクリジニウムエステル等が挙げられる。

過酸化水素測定用試薬として、酸化発色型色原体およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質を含有する試薬を用いる場合には、過酸化水素は、過酸化活性物質の存在下に酸化発色型色原体と反応して色素を生成し、生成した色素を定量することにより、過酸化水素を定量することができる。また、化学発光物質を含有する過酸化水素測定用試薬を用いる場合には、過酸化水素は、化学発光物質と反応して光子を生じ、生じた光子を定量することにより、過酸化水素を定量することができる。

酸化発色型色原体としては、例えばロイコ型色原体、酸化カップリング発色型色原体等が挙げられる。ロイコ型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、単独で色素へ変換される物質である。

ロイコ型色原体としては、例えば 10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3, 7-ビス (ジメチルアミノ) -10H-フェノチアジン (CCAP)、10-N-メチルカルバモイル-3, 7-ビス (ジメチルアミノ) -10H-フェノチアジン (MCDP)、N- (カルボキシメチルアミノカルボニル) -

4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム塩(DA-64)、4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、ビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)等が挙げられる。

酸化カップリング発色型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、2つの化合物が酸化的カップリングして色素を生成する物質である。2つの化合物の組み合わせとしては、カプラーとアニリン類との組み合わせ、カプラーとフェノール類との組み合わせ等が挙げられる。

カプラーとしては、例えば4-アミノアンチピリン(4-AA)、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラジン等が挙げられる。アニリン類としては、N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン(MAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOPS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N, N-ジメチル-3-メチルアニリン、N, N-ジ(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4-フルオロ-3, 5-ジメトキシ

アニリン (F-D A O S) 等が挙げられる。

フェノール類としては、フェノール、4-クロロフェノール、3-メチルフェノール、3-ヒドロキシ-2, 4, 6-トリヨード安息香酸 (H T I B) 等が挙げられる。

過酸化水素の測定において、過酸化活性物質の濃度は、測定に適した濃度であれば特に制限はないが、過酸化活性物質としてペルオキシダーゼを用いる場合は、1 ~ 100 k U / L が好ましい。また、酸化発色型色原体の濃度は、測定に適した濃度であれば特に制限はないが、0.01 ~ 10 g / L が好ましい。

還元型補酵素の測定方法としては、例えば生成した還元型補酵素の吸光度を測定する方法、還元型補酵素測定用試薬を用いる方法等が挙げられる。還元型補酵素の吸光度を測定する方法における吸光度としては、300 ~ 500 nm が好ましく、330 ~ 400 nm がより好ましく、340 nm 付近が特に好ましい。還元型補酵素測定用試薬は、生成した還元型補酵素を検出可能な物質へ変換するための試薬である。検出可能な物質としては、例えば色素等が挙げられる。検出可能な物質が色素の場合の還元型補酵素測定用試薬としては、例えばジアホラーゼ、電子キャリアーおよび還元発色型色原体を含有する試薬が挙げられる。電子キャリアーとしては、例えば1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェート等が挙げられる。還元型補酵素測定用試薬として、ジアホラーゼ、電子キャリアーおよび還元発色型色原体を含有する試薬を用いる場合には、還元発色型色原体が変換されて生成した色素を定量することにより、還元型補酵素を定量することができる。

還元発色型色原体としては、例えば3-(4, 5-ジメチル-2-チアゾリル)-2, 5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム ブロミド (M T T)、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2, 4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム モノナトリウム塩 (W S T-1)、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2, 4-ジニトロフェニル)-5-(2, 4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム モノナトリウム塩 (W S T-3) 等が挙げられる。



(HDL コレステロール測定用試薬)

本発明のHDL コレステロール測定用試薬としては、例えば以下の態様の試薬が挙げられる。

試薬 1

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

試薬 2

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

試薬 3

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミンおよび酸化型補酵素を含有する試薬。

試薬 4

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、胆汁酸誘導体および酸化型補酵素を含有する試薬。

試薬 5

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

試薬 6

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、胆汁酸誘導体、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

### 試薬 7

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

### 試薬 8

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミン、陰イオン性胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

### 試薬 9

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステル、陰イオン性胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

### 試薬 10

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルおよび酸化型補酵素を含有する試薬。

### 試薬 11

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミン、陰イオン性胆汁酸誘導体および酸化型補酵素を含有する試薬。

### 試薬 12

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステル、陰イオン性胆汁酸誘導体および酸化型補酵素を含有する試薬。

### 試薬 1 3

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステル、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

### 試薬 1 4

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミン、陰イオン性胆汁酸誘導体、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

### 試薬 1 5

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステル、陰イオン性胆汁酸誘導体、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

本発明のHDLコレステロール測定用試薬においては、前述の本発明のHDLコレステロールの測定方法において挙げられたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、胆汁酸誘導体、過酸化水素測定用試薬、酸化型補酵素、還元型補酵素測定用試薬を用いることができる。

#### (HDLコレステロール測定用キット)

本発明のHDLコレステロール測定用試薬は、キットの形態で保存、流通および使用されてもよい。キットの形態としては、特に制限はなく、2試薬系、3試薬系等のいずれであってもよいが、2試薬系が好ましい。

第一試薬と第二試薬とからなる2試薬系のHDLコレステロール測定用キットにおいては、コレステロールエステル加水分解酵素と、コレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素とは、第一試薬と第二試薬に別々に含有されても、第二試薬と一緒に含有されてもよいが、第一試薬と第二試薬に別々

に含有される場合には、コレステロールエステル加水分解酵素が第一試薬に、コレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素が第二試薬に含有される態様が好ましい。ポリアニオンは、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよいが、第一試薬に含有されることが好ましい。非イオン性界面活性剤およびアルブミンは、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。コレステロール脱水素酵素を用いた測定法において使用される酸化型補酵素は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。

過酸化水素測定用試薬は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよいが、当該試薬が酸化カップリング型色原体を含有する場合には、酸化カップリング型色原体のそれぞれの化合物は別々の試薬に含有される態様が好ましい。還元型補酵素測定用試薬は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。また、胆汁酸誘導体は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。

本発明のキットは例えば下記の態様のものが挙げられる。

第一試薬および第二試薬からなるキットであって、コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび過酸化水素測定試薬、必要に応じて胆汁酸誘導体、安定化剤、防腐剤、影響物質消去剤の各々を任意に第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有し、コレステロール酸化酵素を第二試薬に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

ポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、コレステロールエステル加水分解酵素、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび過酸化水素測定試薬、必要に応じて胆汁酸誘導体、安定化剤、防腐剤、影響物質消去剤の各々を任意に第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

第一試薬および第二試薬からなるキットであって、コレステロールエステル

加水分解酵素、ポリアニオン、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび酸化型補酵素、必要に応じて還元型補酵素測定用試薬、胆汁酸誘導体、安定化剤、防腐剤、影響物質消去剤の各々を任意に第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有し、コレステロール脱水素酵素を第二試薬に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

ポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬とを含有し、コレステロールエステル加水分解酵素、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび酸化型補酵素、必要に応じて還元型補酵素測定用試薬、胆汁酸誘導体、安定化剤、防腐剤、影響物質消去剤の各々を任意に第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

第一試薬および第二試薬からなるキットであって、コレステロールエステル加水分解酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体および過酸化水素測定試薬、必要に応じてポリアニオン、アルブミン、安定化剤、防腐剤および影響物質消去剤の各々を任意に第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有し、コレステロール酸化酵素を第二試薬に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

第一試薬および第二試薬からなるキットであって、コレステロールエステル加水分解酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体および酸化型補酵素、必要に応じて、還元型補酵素測定用試薬、ポリアニオン、アルブミン、安定化剤、防腐剤および影響物質消去剤の各々を任意に第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有し、コレステロール脱水素酵素を第二試薬に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

より具体的には、例えば以下の態様のキットが挙げられるが、これらは本発

明の範囲を何ら限定するものではない。

#### キット 1

##### 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 2

##### 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 3

##### 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 4

##### 第一試薬

ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

キット5

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

キット6

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

キット7

## 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミンおよび非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

キット8

## 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および胆汁酸誘導体を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

キット9

## 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミンおよび非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

#### 第二試薬

コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体および酸化型補酵素を含有する試薬。

#### キット 10

##### 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミンおよび非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 11

##### 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および胆汁酸誘導体を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 12

##### 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミンおよび非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素、胆汁酸誘導体および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。



キット 13

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミンおよび非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

キット 14

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および胆汁酸誘導体を含有する試薬。

キット 15

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および胆汁酸誘導体を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

キット 16

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミンおよび非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

キット 17

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素、還元型補酵素測定用試薬および胆汁酸誘導体を含む試薬。

### キット 18

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および胆汁酸誘導体を含む試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含む試薬。

### キット 19

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミンおよび過酸化水素測定用試薬を含む試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、非イオン性界面活性剤および過酸化水素測定用試薬を含む試薬。

### キット 20

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミン、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含む試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、非イオン性界面活性剤および過酸化水素測定用試薬を含む試薬。

### キット 21

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミンおよび過酸化水素測定用試薬を含む試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、非イオン

性界面活性剤、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 2 2

##### 第一試薬

ポリアニオンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、アルブミン、非イオン性界面活性剤および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 2 3

##### 第一試薬

ポリアニオン、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、アルブミン、非イオン性界面活性剤および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 2 4

##### 第一試薬

ポリアニオンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、アルブミン、非イオン性界面活性剤、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 2 5

##### 第一試薬

陰イオン性胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

### キット 2.6

#### 第一試薬

過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、アニオン性胆汁酸誘導体、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

### キット 2.7

#### 第一試薬

ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

### キット 2.8

#### 第一試薬

過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

本発明のHDLコレステロール測定用キットにおいては、前述の本発明のHDLコレステロールの測定方法において挙げられたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、胆汁酸誘導体、過酸化水素測定用試薬、酸化型補酵素、還元型補酵素測定用試薬を用いることができる。

本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットには、必要に応じて前述の、水性媒体、安定化剤、防腐剤、影響物質消去剤、反応促進剤等が含有されてもよい。

本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットは、凍結乾燥された状態でも、水性媒体に溶解された状態でもよい。凍結乾燥された状態の試薬を用いて検体中のHDLコレステロールを測定する場合には、当該試薬は水性媒体に溶解して使用される。

本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおけるコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、コレステロール脱水素酵素の含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.01～800U/mLとなる含量が好ましく、0.02～400U/mLとなる含量がより好ましい。本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおける非イオン性界面活性剤の含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.0001～10%となる含量が好ましく、0.001～5%となる含量がより好ましい。本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおけるポリアニオンの含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.001～10%となる含量が好ましく、0.01～5%となる含量がより好ましい。

本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおけるアルブミンの含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.001～10%となる含量が好ましく、0.01～5%となる含量がより好ましい。本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおける胆汁酸誘導体の含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.001～10%となる含量が好ましく、0.01～5%となる含量がより好ましい。

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。尚、本実施例においては、下記メーカーの試薬および酵素を使用した。

HEPES (BDH Laboratory社製)、EMSE (ダイトーケ

ミックス社製)、デキストラン硫酸ナトリウム(分子量50万)(ファルマシア社製)、デキストラン硫酸ナトリウム(分子量8万)(ICN社製)、レカラギナン(純正化学社製)、ヘパリンリチウム(和光純薬社製)、リントングステン酸ナトリウム(関東化学社製)、ウシ血清アルブミン(BSA;オリエンタル社製)、4-アミノアンチピリン(埼京化成社製)、ペルオキシダーゼ(東洋紡績社製)、LPL311(コレステロールエステル加水分解酵素;東洋紡績社製)、COO321(コレステロールオキシダーゼ;東洋紡績社製)、LPL6(コレステロールエステル加水分解酵素;天野エンザイム社製)、ナイミーンL207(ポリオキシエチレンドデシルアミン;日本油脂社製)、ナイミーンS204(ポリオキシエチレンオクタデシルアミン;日本油脂社製)、ナイミーンS210(ポリオキシエチレンオクタデシルアミン;日本油脂社製)、ニューコールOD420(ポリオキシエチレンオクタデシルアミン;日本乳化剤社製)、パイオニンD3104(ポリオキシエチレンラウリルアミン;竹本油脂社製)、パイオニンD3110(ポリオキシエチレンラウリルアミン;竹本油脂社製)、パイオニンD3605[ポリオキシエチレンアルキル(大豆)アミン;竹本油脂社製]、ニューコール2608F(ポリオキシアルキレン多環フェニルエーテル;日本乳化剤社製)、ニッコールR1020(ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテルホルムアルデヒド縮合物;日光ケミカルズ社製)、アデカプルロニックTR704(エチレンジアミンポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン縮合物;旭電化社製)、エマルミンL90S(ポリオキシエチレンラウリルエーテル;三洋化成社製)、コール酸ナトリウム(ACROS社製)、タウロコール酸ナトリウム(東京化成社製)、グリココール酸ナトリウム(東京化成社製)、ニューコール740-SF、ニューコール707-SF(いずれもポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステル塩;日本乳化剤社製)。

#### 発明を実施するための最良の形態

参考例1 化学修飾LPL311(化学的に修飾されたLPL311)の調製  
HEPES緩衝液(pH8.5, 0.15 mol/L)に、LPL311

を 33 g/L となるように加え 5℃ に冷却した後、サンブライト VFM-4101 (日本油脂社製) を 330 g/L となるよう加え、さらに 3 時間反応させた。得られた修飾酵素溶液を精製分離せずそのまま化学修飾 LPL311 として使用した。

#### 実施例 1 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

##### 第一試薬 (試薬 A)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量 50 万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミーン L207	0.07 g/L

##### 第二試薬 (試薬 a)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

#### 実施例 2 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

##### 第一試薬 (試薬 A)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量 50 万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミーン L207	0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬b)

HEPES (pH7. 0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例3 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬A)

HEPES (pH7. 5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミーンL207	0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬c)

HEPES (pH7. 0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例4 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬A)

HEPES (pH7. 5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L



デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミーンL207	0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬d)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 比較例1 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬B)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L

## 第二試薬 (試薬a)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 比較例2 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬C)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
---------------	-----------

EMSE	0.3 g/L
------	---------

デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
------------------------	---------

第二試薬 (試薬a)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
---------------	-----------

4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
-------------	---------

ペルオキシダーゼ	20 kU/L
----------	---------

LPL6	0.05 kU/L
------	-----------

COO321	3.0 kU/L
--------	----------

比較例3 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

第一試薬 (試薬D)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
---------------	-----------

EMSE	0.3 g/L
------	---------

ナイミーンL207	0.07 g/L
-----------	----------

第二試薬 (試薬a)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
---------------	-----------

4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
-------------	---------

ペルオキシダーゼ	20 kU/L
----------	---------

LPL6	0.05 kU/L
------	-----------

COO321	3.0 kU/L
--------	----------

比較例4 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

第一試薬 (試薬E)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
---------------	-----------

EMSE	0.3 g/L
------	---------

デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
------------------------	---------

BSA

2.0 g/L

## 第二試薬 (試薬 a)

HEPES (pH7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

LPL6

0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

## 比較例5 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬F)

HEPES (pH7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

BSA

2.0 g/L

ナイミーンL207

0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬 a)

HEPES (pH7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

LPL6

0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

## 比較例6 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬G)

HEPES (pH7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)

1.0 g/L

ナイミーンL207

0.07 g/L

## 第二試薬（試薬a）

HEPES (pH7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

LPL6

0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

## 実施例5 HDLコレステロールの測定

実施例1のキットを用いて、日立7170型自動分析装置によりヒト血清40検体中のHDLコレステロールを測定した。

### (1) 検量線の作成

標準液として、生理食塩水（HDLコレステロール濃度：0.0mg/dL）および血清（HDLコレステロール濃度：60.0mg/dL）を、キットとして実施例1のキットを用いて、日立7170型自動分析装置により、HDLコレステロール濃度と「吸光度」との間の関係を示す検量線を作成した。

ここでの「吸光度」とは、以下の反応で測定された2つの吸光度（E1およびE2）を基に、E2からE1を差し引くことにより得られた値を表す。

反応セルへ標準液（3μL）と第一試薬（0.24mL）とを添加し37℃で5分間加温し、反応液の吸光度（E1）を主波長600nm、副波長700nmで測定し、次いで、この反応液に第二試薬（0.08mL）を添加しさらに37℃で5分間加温し、反応液の吸光度（E2）を主波長600nm、副波長700nmで測定した。

### (2) ヒト血清検体と実施例1のキットとの反応による当該検体における「吸光度」の算出

(1)の検量線の作成において用いた標準液の代わりにヒト血清検体を用いる以外は、(1)の「吸光度」の算出方法と同様の方法により、当該検体における「吸光度」を算出した。

### (3) ヒト血清検体中のHDLコレステロール濃度の測定

(2) で算出した「吸光度」と、(1) で作成した検量線とから、各検体中のHDLコレステロール濃度を測定した。

#### 実施例 6 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 2 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 7 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 3 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 8 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 4 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 比較例 7 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 1 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 比較例 8 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 2 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 比較例 9 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 3 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 比較例 10 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 4 のキットを用いる以外は実施例 5 の測

定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 11 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 5 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 12 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 6 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

次に、実施例 5～8 および比較例 7～12 の測定において用いたヒト血清 40 検体を用いて、クリニカルケミストリー第 45 巻、10 号（1999 年）に記載された DCM 法（Designated Comparison Method）により当該検体中の HDL コレステロールを測定し、各実施例および比較例での値と比較した。

実施例 5～8 および比較例 7～12 それぞれの測定法と、DCM 法による測定法との相関係数を表 1 に示す。

表 1

測定法	測定キット		相関係数
	第一試薬	第二試薬	
実施例 5	試薬 A	試薬 a	0.960
実施例 6	試薬 A	試薬 b	0.958
実施例 7	試薬 A	試薬 c	0.983
実施例 8	試薬 A	試薬 d	0.996
比較例 7	試薬 B	試薬 a	0.590
比較例 8	試薬 C	試薬 a	0.385
比較例 9	試薬 D	試薬 a	0.388
比較例 10	試薬 E	試薬 a	0.800
比較例 11	試薬 F	試薬 a	0.405
比較例 12	試薬 G	試薬 a	0.118

実施例 5 と、比較例 7～12 との比較から、コレステロール測定用酵素以外に、BSA、デキストラン硫酸ナトリウムおよびポリオキシエチレンアルキルアミンをすべて含有するキットを用いた測定においてのみ、DCM法による測定と良い相関係数が得られることが判明した。実施例 5 と実施例 6 との比較から、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素を用いた測定においても、DCM法による測定と良好な相関係数が得られることが判明した。また、実施例 5 と実施例 7 の比較、実施例 6 と実施例 8 との比較から、コレステロール測定用酵素、BSA、デキストラン硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキルアミンの他に、胆汁酸誘導体の 1 つであるコール酸ナトリウムを加えたキットを用いた測定においても、DCM法による測定と良い相関が認められた。

#### 実施例 9 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

##### 第一試薬 (試薬 H)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量8万)	0.5 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミーンL207	0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬a)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例10 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬I)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
α-カラギナン	0.5 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミーンL207	0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬a)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例11 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キット



を調製した。

第一試薬 (試薬 J)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
ヘパリンリチウム	0.5 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミン L207	0.07 g/L

第二試薬 (試薬 a)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LP L6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

実施例 12 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

第一試薬 (試薬 K)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
リンタングステン酸ナトリウム	0.5 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミン L207	0.07 g/L

第二試薬 (試薬 a)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LP L6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

### 実施例 13 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 9 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

### 実施例 14 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 10 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

### 実施例 15 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 11 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

### 実施例 16 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 12 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

実施例 13～16 それぞれの測定法と、DCM 法による測定法との相関係数を表 2 に示す。

表 2

測定法	測定キット		相関係数
	第一試薬	第二試薬	
実施例 1 3	試薬 H	試薬 a	0. 9 9 5
実施例 1 4	試薬 I	試薬 a	0. 9 8 8
実施例 1 5	試薬 J	試薬 a	0. 9 8 6
実施例 1 6	試薬 K	試薬 a	0. 9 8 3

実施例 5 と実施例 1 3 ～ 1 6 との比較より、デキストラン硫酸ナトリウム（分子量 5 0 万）以外のポリアニオンを用いた場合においても DCM 法の測定に対し良好な相関係数が得られることが判明した。

#### 実施例 1 7 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

##### 第一試薬（試薬 L）

HEPES (pH 7. 5)	1 0 mmol/L
EMSE	0. 3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム（分子量 5 0 万）	1. 0 g/L
BSA	2. 0 g/L
ニューコール OD 4 2 0	0. 0 5 g/L

##### 第二試薬（試薬 a）

HEPES (pH 7. 0)	1 0 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0. 3 g/L
ペルオキシダーゼ	2 0 kU/L
LP L 6	0. 0 5 kU/L
COO 3 2 1	3. 0 kU/L

#### 実施例 1 8 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬M)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
パイオニンD3605	0.01 g/L

## 第二試薬 (試薬a)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例19 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬N)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
エマルミンL90S	0.05 g/L

## 第二試薬 (試薬a)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例20 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

第一試薬（試薬O）

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
ニューコール2608F	0.2 g/L

第二試薬（試薬a）

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

実施例21 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

第一試薬（試薬P）

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
ニコールR1020	0.2 g/L

第二試薬（試薬a）

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

## 実施例22 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬Q)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
アデカプルロニックTR704	1.5 g/L

## 第二試薬 (試薬a)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LP6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例23 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬Q)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
アデカプルロニックTR704	1.5 g/L

## 第二試薬 (試薬b)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L

ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL 311	0.2 kU/L
COO 321	3.0 kU/L

#### 実施例 24 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 17 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 25 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 18 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 26 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 19 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 27 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 20 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 28 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 21 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 29 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 22 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 30 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 2 3 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HD L コレステロールを測定した。実施例 2 4 ~ 3 0 それぞれの測定法と、D C M 法による測定法との相関係数を表 3 に示す。

表 3

測定法	測定キット		相関係数
	第一試薬	第二試薬	
実施例 2 4	試薬 L	試薬 a	0. 9 8 4
実施例 2 5	試薬 M	試薬 a	0. 9 0 9
実施例 2 6	試薬 N	試薬 a	0. 9 3 4
実施例 2 7	試薬 O	試薬 a	0. 9 5 2
実施例 2 8	試薬 P	試薬 a	0. 9 4 9
実施例 2 9	試薬 Q	試薬 a	0. 9 1 3
実施例 3 0	試薬 Q	試薬 b	0. 9 9 3

実施例 5 と同様、ナイミン L 2 0 7 (ポリオキシエチレンドデシルアミン) 以外の非イオン性界面活性剤を用いた場合においても D C M 法の測定に対し良好な相関係数が得られることが判明した。また、実施例 2 9 と実施例 3 0 との比較から、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素を用いた測定においても、D C M 法による測定と良好な相関係数が得られることが判明した

#### 実施例 3 1 HD L コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HD L コレステロール測定用キットを調製した。

##### 第一試薬 (試薬 R)

HEPES (pH 7. 5) 1 0 mmol / L

EMSE 0. 3 g / L

タウロコール酸ナトリウム 2. 7 g / L

##### 第二試薬 (試薬 e)



HEPES (pH7. 0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
パイオニンD3104	0.05 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

### 実施例32 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

#### 第一試薬 (試薬R)

HEPES (pH7. 5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
タウロコール酸ナトリウム	2.7 g/L

#### 第二試薬 (試薬f)

HEPES (pH7. 0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ナイミーンS204	0.05 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

### 実施例33 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

#### 第一試薬 (試薬R)

HEPES (pH7. 5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
タウロコール酸ナトリウム	2.7 g/L

#### 第二試薬 (試薬g)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ナイミーンS210	0.05 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

#### 実施例34 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### 第一試薬 (試薬S)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
コール酸ナトリウム	2.0 g/L

##### 第二試薬 (試薬g)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ナイミーンS210	0.05 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

#### 実施例35 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### 第一試薬 (試薬T)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
グリココール酸ナトリウム	2.4 g/L

##### 第二試薬 (試薬g)

HEPES (pH7. 0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ナイミーンS210	0.05 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

### 実施例36 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

#### 第一試薬 (試薬D)

HEPES (pH7. 5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
ナイミーンL207	0.07 g/L

#### 第二試薬 (試薬d)

HEPES (pH7. 0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

### 実施例37 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

#### 第一試薬 (試薬F)

HEPES (pH7. 5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミーンL207	0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬 d)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾 LPL 311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例 38 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬 G)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量 50 万)	1.0 g/L
ナイミーン L207	0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬 d)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾 LPL 311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 比較例 13 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬 R)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

タウロコール酸ナトリウム

2.7 g/L

第二試薬 (試薬 b)

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

化学修飾 LPL 311

0.2 kU/L

COO 321

3.0 kU/L

比較例 14 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

第一試薬 (試薬 S)

HEPES (pH 7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

コール酸ナトリウム

2.0 g/L

第二試薬 (試薬 b)

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

化学修飾 LPL 311

0.2 kU/L

COO 321

3.0 kU/L

比較例 15 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

第一試薬 (試薬 T)

HEPES (pH 7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

グリココール酸ナトリウム

2.4 g/L

第二試薬 (試薬 b)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL 311	0.2 kU/L
COO 321	3.0 kU/L

#### 比較例 16 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### 第一試薬 (試薬U)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

##### 第二試薬 (試薬e)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
パイオニンD 3104	0.05 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL 311	0.2 kU/L
COO 321	3.0 kU/L

#### 比較例 17 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### 第一試薬 (試薬U)

HEPES (pH 7.5)	1.0 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

##### 第二試薬 (試薬f)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ナイミーンS 204	0.05 g/L

ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL 311	0.2 kU/L
COO 321	3.0 kU/L

#### 比較例18 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### 第一試薬 (試薬U)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

##### 第二試薬 (試薬g)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ナイミーンS210	0.05 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL 311	0.2 kU/L
COO 321	3.0 kU/L

#### 実施例39 HDLコレステロールの測定

実施例1のキットの代わりに実施例31のキットを用いる以外は実施例5の測定法と同様にして、日立7170形自動分析装置によりヒト血清40検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例40 HDLコレステロールの測定

実施例1のキットの代わりに実施例32のキットを用いる以外は実施例5の測定法と同様にして、日立7170形自動分析装置によりヒト血清40検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例41 HDLコレステロールの測定

実施例1のキットの代わりに実施例33のキットを用いる以外は実施例5の測定法と同様にして、日立7170形自動分析装置によりヒト血清40検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 4 2 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 3 4 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 4 3 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 3 5 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 4 4 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 3 6 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 4 5 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 3 7 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 4 6 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 3 8 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 1 9 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 1 3 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 2 0 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 1 4 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。



#### 比較例 2 1 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 1 5 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 2 2 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 1 6 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 2 3 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 1 7 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 2 4 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 1 8 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

実施例 3 9 ~ 4 6 および比較例 1 9 ~ 2 4 それぞれの測定法と、DCM 法による測定法との相関係数を表 4 に示す。

表 4

測定法	測定キット		相関係数
	第一試薬	第二試薬	
実施例 3 9	試薬 R	試薬 e	0. 9 9 2
実施例 4 0	試薬 R	試薬 f	0. 9 8 6
実施例 4 1	試薬 R	試薬 g	0. 9 9 4
実施例 4 2	試薬 S	試薬 g	0. 9 9 4
実施例 4 3	試薬 T	試薬 g	0. 9 9 3
実施例 4 4	試薬 D	試薬 d	0. 9 7 8
実施例 4 5	試薬 F	試薬 d	0. 9 8 8
実施例 4 6	試薬 G	試薬 d	0. 9 8 4
比較例 1 9	試薬 R	試薬 b	0. 9 6 7
比較例 2 0	試薬 S	試薬 b	0. 9 7 5
比較例 2 1	試薬 T	試薬 b	0. 9 7 6
比較例 2 2	試薬 U	試薬 e	0. 6 3 4
比較例 2 3	試薬 U	試薬 f	0. 6 6 5
比較例 2 4	試薬 U	試薬 g	0. 8 8 4

実施例 3 9～4 3 と比較例 1 9～2 4 との比較から、アニオン性胆汁酸誘導体もしくはポリオキシエチレンアルキルアミンのみを含有したキットの測定よりも、両化合物を含有したキットの測定の方が DCM 法による相関係数が良好であることが判明した。また、実施例 4 4 と実施例 4 5～4 6 との比較から、コレステロール測定用酵素、アニオン性胆汁酸誘導体、ポリオキシエチレンアルキルアミンの他に、デキストラン硫酸またはアルブミンを加えたキットを用いた測定においても、DCM 法による測定と良い相関が認められた。

#### 実施例 4 7 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

##### 第一試薬 (試薬 V)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
ニューコール740SF	0.5 g/L

## 第二試薬 (試薬h)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
パイオニンD3110	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例48 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬W)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
ニューコール707SF	0.5 g/L

## 第二試薬 (試薬i)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ナイミーンL207	0.1 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例49 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬W)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
ニューコール707SF	0.5 g/L

## 第二試薬 (試薬h)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
パイオニンD3110	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例50 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬X)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
ニューコール707SF	0.5 g/L

## 第二試薬 (試薬h)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
パイオニンD3110	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例51 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬Y)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L
ニューコール707SF	0.5 g/L

## 第二試薬 (試薬h)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
パイオニンD3110	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 実施例52 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬Z)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
ニューコール707SF	0.5 g/L

## 第二試薬 (試薬h)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
パイオニンD3110	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 比較例 25 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬V)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
ニューコール740SF	0.5 g/L

## 第二試薬 (試薬b)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 比較例 26 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬W)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
ニューコール707SF	0.5 g/L

## 第二試薬 (試薬b)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 比較例 27 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キット

を調製した。

#### 第一試薬（試薬U）

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

#### 第二試薬（試薬h）

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
パイオニンD3110	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

#### 実施例53 HDLコレステロールの測定

実施例1のキットの代わりに実施例47のキットを用いる以外は実施例5の測定法と同様にして、日立7170形自動分析装置によりヒト血清40検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例54 HDLコレステロールの測定

実施例1のキットの代わりに実施例48のキットを用いる以外は実施例5の測定法と同様にして、日立7170形自動分析装置によりヒト血清40検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例55 HDLコレステロールの測定

実施例1のキットの代わりに実施例49のキットを用いる以外は実施例5の測定法と同様にして、日立7170形自動分析装置によりヒト血清40検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例56 HDLコレステロールの測定

実施例1のキットの代わりに実施例50のキットを用いる以外は実施例5の測定法と同様にして、日立7170形自動分析装置によりヒト血清40検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例57 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 5 1 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 5 8 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 5 2 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 2 8 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 2 5 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 2 9 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 2 6 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 3 0 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 2 7 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 形自動分析装置によりヒト血清 4 0 検体中の HDL コレステロールを測定した。

実施例 5 3 ~ 5 8 および比較例 2 8 ~ 3 0 それぞれの測定法と、DCM 法による測定法との相関係数を表 5 に示す。



表 5

測定法	測定キット		相関係数
	第一試薬	第二試薬	
実施例 5 3	試薬 V	試薬 h	0. 9 7 4
実施例 5 4	試薬 W	試薬 i	0. 9 8 1
実施例 5 5	試薬 W	試薬 h	0. 9 8 5
実施例 5 6	試薬 X	試薬 h	0. 9 8 1
実施例 5 7	試薬 Y	試薬 h	0. 9 9 0
実施例 5 8	試薬 Z	試薬 h	0. 9 9 8
比較例 2 8	試薬 V	試薬 b	0. 2 0 1
比較例 2 9	試薬 W	試薬 b	0. 8 7 5
比較例 3 0	試薬 U	試薬 h	0. 8 5 2

実施例 5 3～5 5 と比較例 2 8～3 0 との比較から、ポリオキシエチレン多環フェニル硫酸エステルもしくはポリオキシエチレンアルキルアミンのみを含有したキットの測定よりも、両化合物を含有したキットの測定の方が D C M 法による相関係数が良好であることが判明した。また、実施例 5 5 と実施例 5 6～5 8 との比較から、コレステロール測定用酵素、ポリオキシエチレン多環フェニル硫酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルアミンの他に、デキストラン硫酸及び／またはアルブミンを加えたキットを用いた測定においても、D C M 法による測定と良い相関が認められた。

#### 実施例 5 9 M蛋白血症患者由来の血清中の H D L コレステロールの測定

検体として M 蛋白血症患者より得られた血清を用い、測定用キットとして実施例 1 のキットを用いて実施例 5 の測定法と同様にして日立 7 1 7 0 型自動分析装置により H D L コレステロールの測定を行った。試料に第一試薬を添加し 5 分間反応させた後の吸光度、即ち第二試薬添加前の反応液の吸光度 (E 1) の値を表 6 に、H D L コレステロールの測定値を表 7 に示す。また、比較として、当該 M 蛋白血症患者由来の血清を D C M 法により測定した際の測定値も表 7 に示す。

### 比較例 3 1 M蛋白血症患者由来の血清中のHDLコレステロールの測定

検体としてM蛋白血症患者より得られた血清を用い、測定用キットとして比較例 5 のキットを用いて実施例 5 の測定法と同様にして日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりHDLコレステロールの測定を行った。試料に第一試薬を添加し 5 分間反応させた後の吸光度、即ち第二試薬添加前の反応液の吸光度 (E 1) の値を表 6 に、HDLコレステロールの測定値を表 7 に示す。

表 6

検体	第二試薬添加前の吸光度 (E 1) (m A b s)	
	実施例 5 9	比較例 3 1
M蛋白血症検体 1	1 5 . 7	2 3 6 . 4
M蛋白血症検体 2	1 2 . 2	1 8 9 . 5
M蛋白血症検体 3	9 . 8	1 0 5 . 2
一般検体	6 . 2	6 . 1

表 6 に示すように比較例 5 の測定キットを用いた場合には、第二試薬が添加される前においても水不溶性の蛋白に起因する濁りが解消されていないが、デキストラン硫酸ナトリウムを含有する実施例 1 の測定キットを用いた場合には、第二試薬が添加される前には水不溶性の蛋白に起因する濁りが解消されていることが判明した。

表 7

検体	測定値 (m g / d L)		
	実施例 5 9	比較例 3 1	DCM法
M蛋白血症検体 1	2 8 . 2	4 7 . 3	3 1 . 2
M蛋白血症検体 2	1 5 . 5	9 . 5	1 6 . 0
M蛋白血症検体 3	2 2 . 8	2 6 . 1	2 2 . 8
一般検体	6 6 . 2	5 7 . 6	6 8 . 8

表 7 に示した通り、実施例 1 のキットを用いた測定 (実施例 5 9) での測定値は、DCM法での測定値とほぼ一致したが、比較例 5 のキットを用いた測定 (比較例 3 1) での測定値は、実施例 5 9 の方法やDCM法での測定値とは大

きく異なっており、正確な測定を反映するものではなかった。このように、本発明のキットを用いることにより、M蛋白血症患者検体中のHDLコレステロールをも正確に測定できることが明らかとなった。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、簡便、かつ、正確な測定ができるHDLコレステロールの定方法、測定用試薬および測定用キットが提供される。

## 請求の範囲

1. 検体と、i) コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、ii) コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、非イオン性界面活性剤、ポリアニオンおよびアルブミンを含有する水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法。
2. 水性媒体が、胆汁酸誘導体を含有する請求項1記載の方法。
3. 胆汁酸誘導体が、陰イオン性胆汁酸誘導体である請求項2記載の測定方法。
4. 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンである請求項1～3のいずれかに記載の測定方法。
5. ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である請求項1～4のいずれかに記載の測定方法。
6. 非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。
7. 非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。
8. さらに、還元型補酵素測定用試薬を含有する請求項7記載の試薬。
9. さらに、胆汁酸誘導体を含有する請求項6～8のいずれかに記載の試薬。
10. 胆汁酸誘導体が、陰イオン性胆汁酸誘導体である請求項9記載の試薬。
11. 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンである請求項6～10のいずれかに記

載の試薬。

12. ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である請求項 6 ～ 11 のいずれかに記載の試薬。

13. 第一試薬および第二試薬からなるキットであって、コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび過酸化水素測定試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有し、コレステロール酸化酵素を第二試薬に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

14. ポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、コレステロールエステル加水分解酵素、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび過酸化水素測定試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

15. コレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬と、ポリアニオン、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび酸化型補酵素を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

16. ポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬とを含有し、コレステロールエステル加水分解酵素、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび酸化型補酵素を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

17. さらに、還元型補酵素測定用試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する請求項 15 または 16 記載のキット。

18. さらに、胆汁酸誘導体を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する請求項 13 ～ 17 のいずれかに記載のキット。

19. 胆汁酸誘導体が、陰イオン性胆汁酸誘導体である請求項 18 記載のキット。

20. 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンまたはポリオキシエチレンアルケニルアミンである請求項13～19のいずれかに記載のキット。

21. ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である請求項13～20のいずれかに記載のキット。

22. 検体と、i) コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、ii) コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、i) 非イオン性界面活性剤、ポリアニオンおよびアルブミン、またはii) ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよびポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体を含有する水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法。

23. 検体と、i) コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、ii) コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよびポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体を含有する水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法。

24. さらにポリアニオンを含有する請求項23記載の方法。

25. ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である請求項23または24記載の方法。

26. さらにアルブミンを含有する請求項23～25のいずれかに記載の方法。

27. ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよびポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体、コレステロールエステル加水分解酵素、コ

レステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

28. ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミンおよびポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体、コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

29. さらに、還元型補酵素測定用試薬を含有する請求項 28 記載の試薬。

30. さらにポリアニオンを含有する請求項 27～29 のいずれかに記載の試薬。

31. ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である請求項 30 記載の試薬。

32. さらにアルブミンを含有する請求項 27～31 のいずれかに記載の試薬。

33. 第一試薬および第二試薬からなるキットであって、コレステロールエステル加水分解酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレン多環フェニルエーテル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体および過酸化水素測定試薬の各々を任意に第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有し、コレステロール酸化酵素を第二試薬に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

34. 第一試薬および第二試薬からなるキットであって、コレステロールエステル加水分解酵素、ポリオキシエチレンアルキルアミンもしくはポリオキシエチレンアルケニルアミン、ポリオキシエチレンエーテル多環フェニル硫酸エステルもしくは陰イオン性胆汁酸誘導体および酸化型補酵素の各々を任意に第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有し、コレステロール脱水素酵素を第二試薬に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

35. さらに、還元型補酵素測定用試薬を含有する請求項 3 4 記載のキット
36. さらにポリアニオンを含有する請求項 3 3 ～ 3 5 のいずれかに記載のキット。
37. さらにアルブミンを含有する請求項 3 3 ～ 3 6 のいずれかに記載のキット。



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13258

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/60, C12Q1/26, C12Q1/32, C12Q1/44, G01N33/92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-3/00, G01N33/00-98

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JP 09-285298 A (IATRON LAB. INC.), 04 November, 1997 (04.11.97), (Family: none)	6-8, 12-17, 21 /9-11, 18-20, 27-37 /1-5, 22-26
Y/A	WO 97/40376 A1 (IATRON LAB. INC.), 30 October, 1997 (30.10.97), & JP 09-537922 A	9, 10, 18, 19, 27, 28, 33, 34 /1-8, 11-17, 20-26, 29-32, 35-37
A	WO 95/24502 A1 (KYOWA MEDEX CO., LTD.), 14 September, 1995 (14.09.95), & JP 08-131197 A & EP 699767 A1 & US 5691159 A & US 5888755 A	1-37

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
11 November, 2003 (11.11.03)Date of mailing of the international search report  
25 November, 2003 (25.11.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13258

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/52480 A1 (INT. REAGENTS CORP.), 08 September, 2000 (08.09.00), & JP 2000-602641 A & EP 1158299 A1	1-37
A	JP 08-116996 A (TOYOBO Kabushiki Kaisha), 14 May, 1996 (14.05.96), (Family: none)	1-37

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q 1/60, C12Q 1/26, C12Q 1/32, C12Q 1/44,  
G01N 33/92

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q 1/00-3/00, G01N 33/00-98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	JP 09-285298 A (IATRON LAB. INC.) 1997. 11. 04 (ファミリーなし)	6-8, 12-17, 21 /9-11, 18-20, 27-37 /1-5, 22-26
Y/A	WO 97/40376 A1 (IATRON LAB. INC.) 1997. 10. 30 & JP 09-537922 A	9, 10, 18, 19, 27, 28, 33, 34 /1-8, 11-17, 20-26, 29-32, 35-37

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 11. 03

国際調査報告の発送日

25.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 95/24502 A1 (KYOWA MEDEX CO. LTD.) 1995. 09. 14 & JP 08-131197 A & EP 699767 A1 & US 5691159 A & US 5888755 A	1-37
A	WO 00/52480 A1 (INT. REAGENTS CORP.) 2000. 09. 08 & JP 2000-602641 A & EP 1158299 A1	1-37
A	JP 08-116996 A (TOYOCO KK) 1996. 05. 14 (ファミリーなし)	1-37